

STUDI KOMPARATIF TOKSISITAS LC_{50} AFLATOKSIN, OKHRATOKSIN, ZEARALENON PADA KACANG TANAH (*Arachis Hypogaea L*)

COMPARATIVE STUDY TOXICITY LC_{50} AFLATOXIN, OCHRATOXIN, ZEARALENON IN PEANUT (*Arachis Hypogaea L*)

R. Haryo Bimo Setiarto

Peneliti Bidang Biokimia Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI

Jalan Raya Jakarta-Bogor Km 46, Kawasan Cibinong Science Centre

e-mail: haryobimo42@yahoo.com

ABSTRACT

Aflatoxin, ochratoxin, zearalenon is a compound resulted from metabolism process *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium graminearum* which grows in moist peanut. A long period and over dose of aflatoxin, ochratoxin, zearalenon can be caused liver cancer, cirrhosis, carcinoma, chronic hepatitis, jaundice, food absorption disturbance, digestion disturbance and immunosuppressive. This research have focused on comparative study about toxicity aflatoxin, okhratoxin and zearolenon compound. The result of toxicity test by using *Artemia salina*, it was knowingly detected that LC_{50} value from crude extract peanut of ochratoxin, zearalenon, aflatoxin was 296.82 ppm, 366.28 ppm, 251.55 ppm respectively. Finally it can be concluded that aflatoxin compound from peanut sample had toxicity effect of the most dangerous than other compound (ochratoxin, zearolenon) due to lethal 50% *Artemia salina* population in smallest concentration.

Keywords: Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenon, Toxicity Test LC_{50} peanut (*Arachis hypogaea L*)

ABSTRAK

Aflatoksin, okhratoksin, zearalenon adalah senyawa yang dihasilkan dari proses metabolisme fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* dan *Fusarium graminearum* pada kacang tanah yang lembab. Konsumsi aflatoksin, okhratoksin, zearalenon dalam dosis tinggi dan jangka panjang dapat menyebabkan kanker hati, sirosis, karsinoma, hepatitis kronis, penyakit kuning, gangguan pada penyerapan makanan, gangguan pencernaan dan penurunan sistem imun. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi komparatif terhadap toksisitas senyawa aflatoksin, okhratoksin, zearalenon. Pengujian toksisitas LC_{50} dilakukan dengan menggunakan *Artemia salina* sebagai hewan uji. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa nilai LC_{50} dari ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung okhratoksin, zearalenon dan aflatoksin berturut-turut adalah 296.82 ppm, 366.28 ppm, dan 251.55 ppm. Dapat disimpulkan bahwa senyawa aflatoksin yang terkandung dalam sampel kacang tanah memiliki efek toksisitas yang paling berbahaya dibandingkan dengan senyawa lain yang diuji (okhratoksin, zearalenon). Hal ini dikarenakan senyawa ini mampu mematikan 50% populasi *Artemia salina* pada konsentrasi terendah.

Kata Kunci: Aflatoksin, Okhratoksin, Zearalenon, Uji Toksisitas LC_{50} Kacang Tanah (*Arachis hypogaea L*)

PENDAHULUAN

Komoditas pertanian seperti kacang tanah kaya akan kandungan gizi seperti protein, lemak, karbohidrat, dan vitamin. Akan tetapi apabila penanganan pascapanennya kurang tepat ternyata dapat berdampak buruk. Hal ini disebabkan

komoditas pertanian tersebut dapat dicemari oleh senyawa aflatoksin, okhratoksin, zearalenon.¹ Aflatoksin, okhratoksin, zearalenon ialah senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, dan *Fusarium graminearum*. Ketiga fungi tersebut pada umumnya tumbuh pada kacang tanah yang

tidak dikeringkan dengan baik. Apabila senyawa tersebut dikonsumsi dalam jangka panjang dan dalam jumlah besar dapat membahayakan tubuh karena menyebabkan kanker hati, sirosis, karsinoma, hepatoglemia, gangguan pencernaan dan penyerapan nutrisi, serta penurunan daya tahan tubuh sehingga tubuh mudah terserang berbagai macam penyakit.^{2,3,4}

Penyebab utama terjadinya cemaran aflatoksin, okhratoksin, zearalenon pada kacang tanah umumnya terjadi setelah kacang tanah dipanen, dikeringkan, dan disimpan selama 3,5 bulan. Pada masa penyimpanan itu tumbuhlah fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, dan *Fusarium graminearum*. Dalam 28 minggu kandungan aflatoksin, okhratoksin, zearolenon pada kacang tanah dapat mencapai 300 kali dari jumlah yang diperkenankan. Agar tidak ditumbuhi oleh fungi tersebut, seharusnya kadar air kacang tanah di bawah 10%. Komoditi kacang tanah dengan kadar air sebesar 14% dapat menyebabkan tumbuhnya fungi yang memproduksi aflatoksin, okhratoksin, zearolenon.⁵ Keadaan lingkungan dan iklim di Indonesia sangat menunjang pertumbuhan fungi tersebut dalam memproduksi ketiga senyawa metabolit sekunder tersebut.⁶

Penelitian ini bertujuan membandingkan toksisitas senyawa aflatoksin, okhratoksin, zearolenon yang dihasilkan oleh fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, dan *Fusarium graminearum* melalui uji toksisitas LC₅₀. Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon memiliki tingkat toksisitas tinggi apabila nilai LC₅₀ < 1.000 ppm.⁷

METODE PENELITIAN

Bahan, Waktu, dan Tempat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan antara lain sampel kacang tanah yang telah terdeteksi mengandung senyawa aflatoksin, okhratoksin, dan zearolenon yang diperoleh dari laboratorium analisis mikrobiologi pangan, South East Asian Food and Agricultural Science and Technology Center IPB, isolat fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, dan *Fusarium graminearum* (koleksi laboratorium mikrobiologi, Departemen Biologi-FMIPA IPB), larva udang (*Artemia salina*), air

laut, akuades. Penelitian dilakukan di laboratorium biokimia FMIPA IPB, penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2008–Februari 2009.

Uji Toksisitas LC₅₀ Ekstrak Kasar Kacang Tanah yang Mengandung Aflatoksin, Okhratoksin, Zearalenon dengan *Artemia salina*

Uji toksisitas LC₅₀ dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan fase naupli dari *Artemia salina*. Hasil uji toksisitas LC₅₀ dari ketiga senyawa tersebut selanjutnya diolah dengan analisis probit.⁸ Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi pada masyarakat konsumen mengenai bahaya cemaran aflatoksin, okhratoksin, zearolenon pada kacang tanah berdasarkan toksisitas LC₅₀ dari ketiga senyawa tersebut. Uji toksisitas LC₅₀ dengan *Artemia salina* dilakukan pada sampel kacang tanah yang telah terdeteksi mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon berdasarkan uji pendahuluan dengan metode kromatografi lapis tipis dan instrumen HPLC.

Kacang tanah yang telah terdeteksi mengandung cemaran aflatoksin, okhratoksin, zearolenon dihancurkan sampai halus dengan cara diblender, lalu diekstraksi (*solid-liquid*) dengan menggunakan pelarut kloroform sampai kondisi homogen. Setelah itu filtrat yang diperoleh diuapkan pelarut kloroformnya sampai habis sehingga diperoleh ekstrak kasar kacang tanah. Kemudian ekstrak kasar ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam 5 mL air laut sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm. Dari larutan stok tersebut dibuat larutan dengan berbagai variasi konsentrasi yang digunakan untuk uji toksisitas LC₅₀ yaitu 0 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1.000 ppm. *Artemia salina* yang telah tersedia dari laboratorium Biokimia FMIPA IPB, dimasukkan ke dalam media tumbuh sebanyak 20 ekor di setiap lubang pengujian *microplate*. Banyaknya tetes air laut yang dimasukkan ke dalam media dicukupkan hingga volumenya 10 mL atau sebanyak 200 tetes. Kemudian dimasukkan sejumlah ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon sebanyak 1 mL ke dalam media menggunakan pipet mikro. Pengujian toksisitas LC₅₀ dilakukan secara triplo. Media tumbuh *Artemia salina* kemudian diinkubasi pada

suhu 27°C selama 24 jam. Setelah itu, dihitung banyaknya organisme *Artemia salina* yang mati dan dibuat grafik regresi linear hubungan antara log konsentrasi ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon dengan probit kematian *Artemia salina*, sehingga dapat dihitung nilai LC_{50} melalui metode analisis probit dengan *software* SPSS. Ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon memiliki toksisitas yang tinggi apabila memiliki nilai $LC_{50} < 1.000$ ppm.^{7,8}

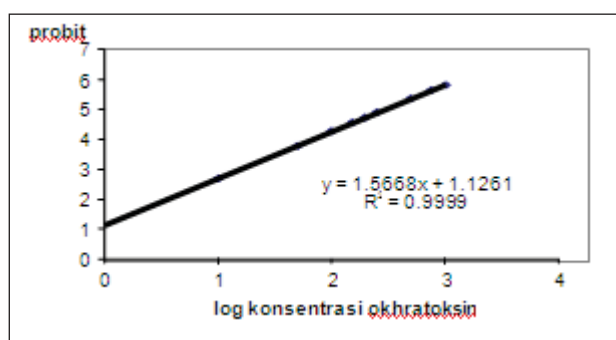
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji toksisitas LC_{50} ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, zearolenon dengan hewan uji *Artemia salina* didasarkan prinsip sederhana bahwa kematian organisme zoologik secara *in vivo* merupakan metode dasar monitoring yang mudah untuk proses penapisan dan fraksinasi ketiga senyawa metabolit sekunder tersebut.⁸

Hasil uji toksisitas LC_{50} sampel ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung okhratoksin

dengan *Artemia salina* tampak pada Tabel 1. Hasil analisis probit menghasilkan persamaan linear $y = 1.5668x + 1.1261$ dengan $R^2 = 0.9999$ (Gambar 1). Dari persamaan linear tersebut diketahui bahwa nilai LC_{50} dari ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung senyawa okhratoksin adalah 296.82 ppm.

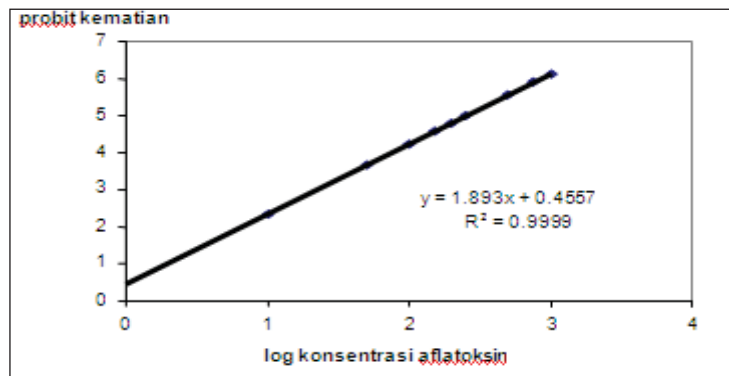
Hasil uji toksisitas LC_{50} sampel ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung senyawa aflatoksin tampak pada Tabel 2. Dengan bantuan program *software* statistik SPSS dapat diperoleh grafik hubungan linearitas antara log konsentrasi ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin dengan probit kematian *Artemia salina*. Analisis probit menghasilkan persamaan linear $y = 1.89295x + 0.45574$ dengan $R^2 = 0.9999$ (Gambar 2). Berdasarkan persamaan linear tersebut diketahui bahwa nilai LC_{50} ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoksin adalah 251.55 ppm. Hipotesis secara statistik untuk analisis probit menunjukkan bahwa χ^2 hitung yaitu 0.9172 lebih kecil daripada χ^2 tabel (7, 0.05) yaitu 12.067, sehingga disimpulkan bahwa



Gambar 1. Grafik regresi linear LC_{50} senyawa okhratoksin pada kacang tanah

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas LC_{50} Ekstrak Kasar Kacang Tanah yang Mengandung Okhratoksin Dengan Menggunakan Larva Udang (*Arthemia salina*)

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva udang awal	Jumlah larva udang yang mati	Jumlah larva udang yang mati rata-rata	% kematian
0	20 ekor	0	0	0%
10	20 ekor	0	1	0.67
50	20 ekor	2	3	2.33
100	20 ekor	4	3	5
150	20 ekor	6	7	5
200	20 ekor	7	8	7
250	20 ekor	9	9	8
500	20 ekor	12	13	13
750	20 ekor	15	14	16
1000	20 ekor	18	17	16



Gambar 2. Grafik regresi linear LC_{50} senyawa aflatoksin pada kacang tanah

Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas LC_{50} Ekstrak Kasar Kacang Tanah yang Mengandung Aflatoksin Dengan Menggunakan Larva Udang (*Artemia salina*)

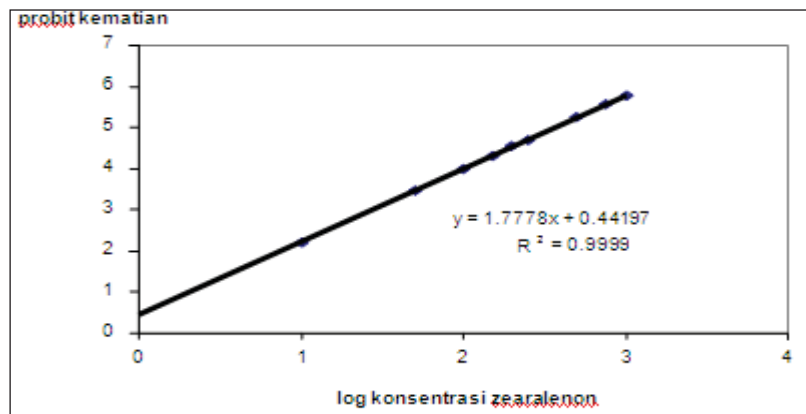
Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva udang awal	Jumlah larva udang yang mati	Jumlah larva udang yang mati rata-rata	% kematian
0	20 ekor	0	0	0%
10	20 ekor	0	0	0.33 1.65%
50	20 ekor	3	1	1.67 8.35%
100	20 ekor	4	5	3 4 20%
150	20 ekor	6	6	7 6.33 31.65%
200	20 ekor	9	8	8 8.33 41.65%
250	20 ekor	11	10	10 10.33 51.65%
500	20 ekor	14	13	15 14 70%
750	20 ekor	17	16	15 16 80%
1000	20 ekor	18	18	19 18.33 91.65%

data hasil percobaan untuk sampel tersebut yang dilakukan secara triplo bersifat homogen dan validitas nilai LC_{50} dari sampel tersebut masih dapat diterima dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

Hasil uji toksisitas LC_{50} sampel ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung senyawa zearolenon tampak pada Tabel 3. Data tersebut diolah dengan bantuan program *software* statistik SPSS, sehingga dapat diperoleh grafik hubungan linearitas antara log konsentrasi ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung zearolenon dengan probit kematian *Artemia salina*. Analisis probit menghasilkan persamaan linear $y = 1.778x + 0.44197$ dengan $R^2 = 0.9999$ (Gambar 3). Berdasarkan persamaan linear tersebut diketahui bahwa nilai LC_{50} ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung zearolenon adalah 366.28 ppm.

Berdasarkan uji lanjut statistika komparatif Tukey dan Duncan (uji beda nyata jujur) nilai LC_{50} dari tiga sampel kacang tanah yang masing-masing mengandung senyawa okhratoksin,

aflatoksin, zearalenon saling berbeda nyata satu sama lain ($\alpha = 0.05$). Diketahui bahwa sampel kacang tanah yang mengandung senyawa aflatoksin memiliki efek toksisitas yang paling berbahaya dibandingkan dengan dua sampel kacang tanah yang mengandung senyawa lain (okhratoksin, zearalenon) karena dapat mematikan sebanyak 50% populasi *Artemia salina* pada konsentrasi yang paling kecil yaitu 251.55 ppm. Sampel kacang tanah yang mengandung okhratoksin memiliki tingkat toksisitas yang juga berbahaya karena nilai LC_{50} sebesar 296.82 ppm lebih kecil jika dibandingkan dengan sampel kacang tanah yang mengandung zearalenon dengan nilai LC_{50} sebesar 366.28 ppm. Secara umum tiga sampel kacang tanah yang mengandung aflatoksin, okhratoksin, dan zearalenon memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (akut) dan sangat berbahaya karena tiga sampel ekstrak kasar kacang tanah tersebut memiliki nilai LC_{50} jauh di bawah 1.000 ppm. Hal tersebut berdasarkan parameter statistika komparatif yaitu uji T dan uji Fischer yang



Gambar 3. Grafik regresi linier LC_{50} senyawa zearalenon pada kacang tanah

Tabel 3. Hasil pengamatan LC_{50} untuk uji toksisitas zearalenon pada kacang tanah dengan menggunakan larva udang (*Artemia salina*)

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva awal	Jumlah larva	Jumlah larva udang yang mati	rata-rata	% kematian
0	20	ekor	0	0	0%
10	20	ekor	1	0.33	1.65%
50	20	ekor	1	1.33	6.65%
100	20	ekor	4	2	15%
150	20	ekor	6	4	23.35%
200	20	ekor	7	6.67	33.35%
250	20	ekor	9	8.67	43.35%
500	20	ekor	11	12	55%
750	20	ekor	14	13	66.67%
1000	20	ekor	16	15.67	78.35%

sangat berbeda nyata ($\alpha = 0.01$). Hasil penelitian ini menjawab hipotesis yang telah dikemukakan sebelumnya yaitu ekstrak kasar kacang tanah yang mengandung aflatoxin, okhratoksin, zearolenon memiliki tingkat toksisitas tinggi (akut) karena nilai $LC_{50} < 1.000$ ppm.⁸

KESIMPULAN

Uji toksisitas LC_{50} dengan menggunakan *Artemia salina* menunjukkan nilai LC_{50} dari ekstrak kasar kacang tanah yang masing-masing mengandung senyawa okhratoksin, aflatoxin, dan zearalenon adalah sebesar 296.82 ppm, 251.55 ppm, dan 366.28 ppm. Sampel kacang tanah yang mengandung aflatoxin memiliki efek toksisitas yang paling berbahaya bila dibandingkan dengan sampel kacang tanah yang mengandung senyawa lain (okhratoksin dan zearalenon). Secara umum senyawa okhratoksin, aflatoxin, dan zearalenon memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (akut).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada ibu Prof. Dr. drh. Maria Bintang, MS dan bapak Ir. Eman Kustaman yang telah bersedia memberikan saran selama berlangsungnya penelitian ini, serta seluruh staf teknisi di laboratorium biokimia FMIPA IPB yang turut membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Winarno, F.G. 1997. *Naskah Akademis Keamanan Pangan*. Bogor: FTDC-IPB.
- ²Almatsier, S. 2002. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- ³Cullen, J.M., Newberne, P.M. 1993. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and agricultural significance*. London: Academic Press.
- ⁴Frank, C.L. 1995. *Toksikologi Dasar*. Edi, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari *Basic of Toxicology*.

- ⁵Dharmaputra, O.S. 1989. “*Aspergillus flavus* and Aflatoxin in Peanut Collected from Three Markets in Bogor, West Java, Indonesia”. *Journal SEAMEO Biotrop*, 5: 111–115.
- ⁶Kasno, A. 2004. “Pencegahan Infeksi *Aspergillus flavus* dan Kontaminasi Aflatoksin Pada Kacang Tanah. *Jurnal Litbang Pertanian*, 23: 75–81.
- ⁷McLaughlin, J.L. 1991. “Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination”. *Methods in plant biochemistry*, 6: 1–30.
- ⁸Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis 3rd ed.* England: Cambridge University Press.